

论著

文章编号:1000-5404(2008)10-0894-03

不稳定逼尿肌中 ICCs 细胞与逼尿肌收缩的关系

封建立¹,李龙坤¹,杨景²,方强¹,丁砺鑫¹,宋波¹ (第三军医大学西南医院:¹全军泌尿外科研究所,²病理学研究所,重庆 400038)

摘要:目的 研究不稳定逼尿肌中 ICCs 细胞的数量、分布形式的变化及其功能改变对逼尿肌肌条收缩的影响,初步探讨 ICCs 细胞与逼尿肌不稳定的关系。方法 近端尿道结扎法建立大鼠不稳定膀胱模型。分别于正常及不稳定膀胱的相同部位剪取 3 mm × 4 mm 逼尿肌组织进行免疫荧光组织化学法检测 c-kit 阳性细胞的表达及分布情况;再于相同部位剪取 2 mm × 7 mm 肌条进行收缩特性测定实验,并检测 c-kit 受体阻断剂对收缩的影响。结果 不稳定逼尿肌中 c-kit 阳性细胞的数量较正常逼尿肌明显增多($P < 0.05$);正常逼尿肌中 c-kit 阳性细胞以散在分布为主,不稳定逼尿肌中以细胞网络形式存在;不稳定逼尿肌肌条的收缩频率和收缩幅度显著高于正常膀胱($P < 0.05$);加入 Glevic 后,不稳定逼尿肌肌条的收缩幅度显著减弱($P < 0.05$),频率无显著差异($P > 0.05$)。结论 不稳定膀胱中 ICCs 细胞的数量明显增加,主要以细胞网络的形式存在;不稳定逼尿肌肌条收缩幅度和频率明显增高,但其收缩幅度可以被 Glevic 削弱,提示 ICCs 与逼尿肌不稳定的发生有密切关系。

关键词: 不稳定膀胱;ICCs 细胞;c-kit 受体

中图分类号: R322.62;R329.25;R694.502

文献标识码: A

Relationship between interstitial cells of Cajal cells and contraction of detrusor myocyte in rats

FENG Jian-li¹, LI Long-kun¹, YANG Jing², FANG Qiang¹, DING Li-li¹, SONG Bo¹ (¹Urinary Surgery Research Center, ²Department of Pathology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the number and distribution of interstitial cells of Cajal (ICCs) in unstable bladder, and their changes on the contraction of muscle strip of unstable detrusor. Methods Detrusor instability model was established by partial bladder outlet obstruction. About a 3 mm × 4 mm detrusor strip was harvested from normal and unstable bladder. The c-kit positive cells were detected by immunofluorescence. About a 2 mm × 7 mm detrusor strip was used to assess the frequency and the amplitude of strip contraction. The effect of c-kit blocker Glevic on unstable strip contraction was evaluated. Results The number of ICCs (c-kit positive cells) increased significantly in unstable bladder than that in stable bladder ($P < 0.05$). ICCs were mostly scattered in normal bladder, but in network distribution in unstable bladder. The contraction amplitude and frequency of unstable strips was significantly higher than that of normal strips. When exposed to Glevic, the contraction amplitude of unstable strips reduced significantly with no influence on contraction frequency. Conclusion The number of ICCs increased significantly and interacted tightly in unstable bladder. The contraction amplitude and frequency of unstable strips is significantly higher than that of normal strips and can be significantly the contraction amplitude can be reduced by Glevic, which might indicate a close relationship between the ICCs and the detrusor instability.

Key words: unstable bladder; ICCs cells; c-kit receptor

基金项目:国家自然科学基金(30672093, 30500505)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30672093, 30500505)

作者简介:封建立,男,河南省太康县人,博士研究生,医师,主要从事膀胱功能障碍方面的研究。电话:(023)60735314

通信作者:宋波,电话:(023)68754186

收稿日期:2007-12-05;修回日期:2008-02-04

不稳定膀胱是临床最常见的膀胱功能障碍之一,逼尿肌肌源性兴奋性增加是其发生的重要机制之一。Cajal 细胞已被证实是胃肠道的慢波起搏细胞,并且参与慢波的传播,对胃肠道的动力学功能起重要的调控作用^[1]。Cajal 间质细胞(interstitial cells of Cajal, ICCs)亦存在于动物泌尿道组织中并参与输尿管及尿

道平滑肌的自发性收缩活动^[2]。我室前期研究也证实膀胱中存在 ICCs 细胞^[2],但其与逼尿肌不稳定的关系少见文献报道。现拟通过对比研究 ICCs 细胞在正常及不稳定膀胱中的分布及其与逼尿肌收缩改变的关系,初步探讨其与不稳定膀胱发生的关系。

1 材料与方法

1.1 实验对象

健康雌性清洁级 SD 大鼠 17 只,3 月龄,体质量 180 ~ 210 g,购自第三军医大学大坪医院野战外科研究所实验动物中心。近端尿道结扎法建立膀胱出口梗阻(BOO)动物模型,6 周后行充盈性膀胱测压,根据测压结果选取 7 只为逼尿肌不稳定组,取同龄正常大鼠 6 只为对照组。

1.2 主要试剂

羊抗大鼠 c-kit 多克隆抗体购自 Santa Cruz 公司, Cy3 标记的兔抗羊二抗购自北京中杉生物公司, 细胞核染料 DAPI 购自碧云天生物公司。

1.3 逼尿肌组织铺片的制作

断颈处死正常及不稳定膀胱 SD 大鼠,结扎双侧输尿管,向膀胱内灌注约 3 ml 4% 多聚甲醛后结扎膀胱颈部。固定 10 min 后将膀胱连同双侧输尿管及近端尿道一同取下,浸泡于 4% 多聚甲醛溶液中常温过夜。分别于正常及不稳定膀胱的相同部位取相同大小逼尿肌组织(约 3 mm × 4 mm),于 0.1 mol/L PBS 中常温过夜,外科手术显微镜下撕去黏膜层、浆膜层以及部分肌层,0.01 mol/L PBS 漂洗后留做免疫组化。

1.4 免疫荧光检测 c-kit 阳性细胞的表达

将制作好的薄层逼尿肌组织片于含 1% BSA 的 0.01 mol/L PBS 中封闭 1 h,然后于 0.01 mol/L PBS 中漂洗 3 次,每次 5 min;加入 1:100 羊抗大鼠 c-kit 一抗稀释液(含 1% BSA 及 0.1% Triton-100),4 °C 孵育过夜;0.01 mol/L PBS 中漂洗 3 次;加入 1:100 兔抗羊二抗稀释液,常温避光孵育 1 h;0.01 mol/L PBS 中漂洗 3 次;于 DAPI 中常温避光孵育 10 min,0.01 mol/L PBS 中漂洗 3 次,前 2 次每次 30 min,最后 1 次 2 h;将组织片平铺于载玻片上,用甘油封片。激光共聚焦显微镜下观察显色情况,照相记录。计数以每视野观察到的细胞数目为单位,每个标本观察 3 个视野,正常及不稳定膀胱各观察 6 个标本,取各视野细胞平均数进行比较。对照实验以羊血清代替二抗。

1.5 逼尿肌局部肌条收缩特性实验

快速断颈处死正常及不稳定膀胱 SD 大鼠,分别于膀胱的相同部位取 2 mm × 7 mm 肌条组织,置于 38 °C Krebs 溶液中,通以 95% O₂ 和 5% CO₂,平衡 30 min 后将肌条一端置于肌槽底端的定挂钩上,另一端悬挂于张力传感器上(量程为 30 g)并与电脑连接,通过 RM6240 生理信号采集处理系统进行记录,分析肌条收缩的频率和幅度。每个肌条检测 20 ~ 30 min,取其中 5 min 的平均值。

1.6 Glevic 对逼尿肌肌条收缩的影响

Glevic 是 c-kit 受体的特异性阻断剂,可以阻断 ICCs 细胞的功能。本研究用来观察阻断前后逼尿肌肌条收缩的改变。Glevic 终浓度为 50 μmol/L。肌条收缩检测方法同前。观察

Glevic 加入前后逼尿肌肌条的收缩改变情况。

1.7 统计学处理

计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,两样本均数的比较采用独立样本 *t* 检验,配对资料的两组均数比较采用配对 *t* 检验。

2 结果

2.1 c-kit 阳性细胞的部位分布差异

膀胱局部逼尿肌组织铺片经免疫荧光染色后在激光共聚焦显微镜下观察的结果如图 1。由染色结果可以看出,不稳定逼尿肌中 c-kit 阳性的细胞数量[(22.0 ± 2.6)/视野]较正常膀胱[(10.5 ± 1.4)/视野]明显增多,差异显著(*P* < 0.05);正常膀胱中 c-kit 阳性细胞以散在分布为主,不稳定膀胱中 c-kit 阳性细胞多以网络形式存在。对照组所有标本均为阴性。

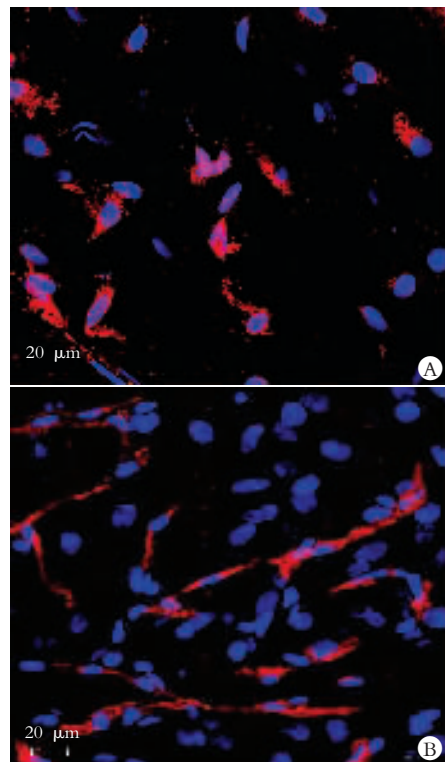


图 1 激光共聚焦显微镜观察正常膀胱(A)与不稳定膀胱(B)顶部 c-kit 阳性细胞

2.2 不同部位肌条收缩特性的差异变化

图 2 为正常及不稳定膀胱局部肌条收缩特性检测结果。正常及不稳定膀胱各检测 6 个标本,所取部位均为顶部,取所测得的收缩幅度及收缩频率平均值进行比较。实验所采取的参数为:灵敏度为 0.3 g,采集频率为 400 Hz,滤波频率为 30 Hz,时间常数为直流。由结果分析可见,正常膀胱的局部肌条收缩频率[(6.83 ± 0.75)次/min]远较不稳定膀胱[(10.83 ± 1.47)次/min]小,差异显著(*P* < 0.05);其收缩幅度[(1.47 ± 0.20) mN]亦远较不稳定膀胱[(2.84 ± 0.20) mN]小,差异显著(*P* < 0.05)。

2.3 c-kit 受体阻断剂对不稳定逼尿肌肌条收缩力的影响

图 3 是加入 Glevic 后逼尿肌肌条的收缩改变情况,共检测

5个肌条标本,由结果分析可见。加入 Glevic 后逼尿肌肌条的收缩幅度 $[(0.59 \pm 0.10) \text{ mN}]$ 较加药前 $[(2.06 \pm 0.20) \text{ mN}]$ 明显减弱($P < 0.05$),加药后收缩频率 $[(5.83 \pm 0.75) \text{ 次}/\text{min}]$ 较加药前 $[(6.17 \pm 0.75) \text{ 次}/\text{min}]$ 没有显著改变($P > 0.05$)。

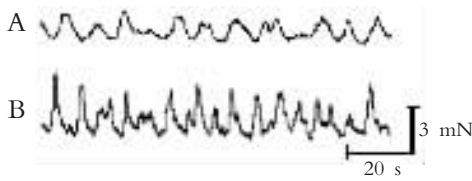
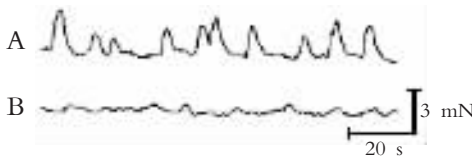


图2 正常膀胱(A)与不稳定膀胱(B)逼尿肌条收缩特性图



A:加药前; B:加药后

图3 Glevic对逼尿肌肌条收缩的影响

3 讨论

Cajal 细胞是胃肠道的慢波起搏细胞,参与起搏信号的产生与传播,并且可以介导神经信号向平滑肌细胞的传送,对胃肠道的动力学功能有着重要的调控作用^[3]。ICCs 细胞是指与胃肠道 Cajal 细胞具有相似生物学功能和形态学特点的一类细胞,其典型形态特点与 Cajal 细胞类似,即呈纺锤状或星状,细胞核大,卵圆形,染色质分散,细胞质少,通常具有 2~5 条长的突起,有时发出多级细支形成网络。

c-kit 是位于质膜上的酪氨酸激酶生长因子受体 (tyrosine kinase growth factor receptor),可表达于造血细胞、肥大细胞及 ICCs 等多种细胞。制备抗 c-kit 抗体可选择性标识有关细胞。近年发展起来的 c-kit 免疫组化染色已经成功地应用于 ICCs 相关的研究,并促进了对 ICCs 的认识。

ICCs 能产生自发性电活动或起搏电流,导致平滑肌的收缩,进而影响器官功能活动,因此有关 ICCs 细胞的研究已经成为许多平滑肌器官动力学功能研究的热点领域,更有学者认为,ICCs 细胞可能是绝大多数平滑肌器官自发性电兴奋的起源^[1]。泌尿系器官均属于平滑肌器官,理论上也应该存在 ICCs 细胞。由于 c-kit 抗体在泌尿系器官仅标记肥大细胞和 ICCs 细胞,而通过形态学特点可以很容易识别肥大细胞,因此 ICCs 细胞的形态学研究可以利用 c-kit 染色来进行,这就为研究 ICCs 细胞在泌尿系器官的分布及其功能提供了很好的基础。在此基础上,Lang 等^[4,5]在上尿路和尿道平滑肌中发现了 ICCs 细胞。人和豚鼠的膀胱中也存在 ICCs 细胞^[5],但有关 ICCs 细胞与膀胱动力学功能的关系的研究还仅仅处于起步阶段,现有文献

报道仅涉及正常膀胱中 ICCs 细胞的形态学研究。

我们的前期研究表明大鼠膀胱中存在 ICCs 细胞^[6],本研究将 ICCs 细胞的形态学改变与膀胱功能障碍性疾病联系起来,探讨其与不稳定膀胱发生的关系。结果表明,不稳定膀胱中 ICCs 细胞的数量及存在形式都发生了改变,即数量增多,细胞网络化更加明显。我们推测这种改变容易导致不稳定膀胱的发生,其可能的机制是:①随着 ICCs 细胞数量的增多,局部自发性放电增强,当其空间总和达到平滑肌的阈电位时即可触发平滑肌的收缩活动。②ICCs 细胞网络的加强意味着电信号传导将更加便捷。平滑肌细胞及其神经支配不是一对一的对应关系,多个平滑肌细胞同步收缩的前提条件是动作电位信号同步到达各个细胞,而发达的 ICCs 细胞网络有利于这一目标的实现。当然,以上两种情况存在的前提条件是 ICCs 细胞和平滑肌之间存在某种形式的电突触连接,尚需更深入研究加以证明。

本研究结果显示,不稳定逼尿肌肌条的收缩频率和幅度较正常膀胱明显提高。我们推测其可能与不稳定逼尿肌中 ICCs 细胞数目的增多有关。因为随着 ICCs 细胞数目的增多,局部电位的空间总和增大,进而导致局部肌条的兴奋性增高,收缩频率和幅度增大。本研究中,我们应用 c-kit 受体特异性阻断剂 Glevic 阻断 ICCs 细胞功能,发现不稳定逼尿肌肌条的收缩幅度明显减弱,提示 ICCs 细胞与逼尿肌收缩有密切关系,可能与逼尿肌不稳定的发生有关。

本研究表明,逼尿肌不稳定时 ICCs 细胞的分布及功能均有显著改变,并可能与逼尿肌的兴奋及收缩功能相关,但其深入的机制,如 ICCs 细胞电生理特性、ICCs 细胞与平滑肌细胞的关系,以及与膀胱功能障碍性疾病间的关系等,有待更深一步研究。

参考文献:

- [1] 沈文浩,李为兵. 胃肠道起搏细胞在豚鼠泌尿道分布研究[J]. 第三军医大学学报, 2006, 28(2): 172-173.
- [2] McHale N, Hollywood M, Sergeant G, et al. Origin of spontaneous rhythmicity in smooth muscle[J]. J Physiol, 2006, 570(Pt 1): 23-28.
- [3] Huizinga J D, Robinson T L, Thomsen L. The search for the origin of rhythmicity in intestinal contraction; from tissue to single cells[J]. Neurogastroenterol Motil, 2000, 12(1): 3-9.
- [4] Lang R J, Klemm M F. Interstitial cell of Cajal-like cells in the upper urinary tract[J]. J Cell Mol Med, 2005, 9(3): 543-556.
- [5] Sergeant G P, Thornbury K D, McHale N G, et al. Interstitial cells of Cajal in the urethra[J]. J Cell Mol Med, 2006, 10(2): 280-291.
- [6] 封建立,方强,丁砺鑫,等. ICCs 细胞在正常大鼠膀胱中的分布及对逼尿肌收缩的影响[J]. 第三军医大学学报, 2008, 30(7): 558-560.

(编辑 王红)